

УДК 619:615.065:636.028

ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ АМИНОСЕЛЕФЕРОНА В ОСТРОМ И ХРОНИЧЕСКОМ ОПЫТЕ**Востроилова Г.А., Хохлова Н.А., Канторович Ю.А., Корчагина А.А.**

ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии РАСХН», г. Воронеж, Российская Федерация

*В статье приведены результаты исследования параметров острой и хронической токсичности комплексного препарата «Аминоселеферон». При изучении острой токсичности на белых мышах и крысах не было отмечено признаков нейротоксичности и других вегетативных симптомов. Аминоселеферон не проявил токсических свойств в остром опыте, LD₅₀ - определить не удалось. Хроническое введение препарата не вызывало существенных изменений в клиническом состоянии животных, но под его влиянием отмечена выраженная тенденция повышения интенсивности роста крыс. Аминоселеферон не оказывал негативного влияния на морфологические и биохимические показатели крови, характеризующие функциональное состояние внутренних органов. Макроскопическое исследование внутренних органов показало, что препарат не вызывал у животных патологических изменений в органах и тканях. **Ключевые слова:** аминоселеферон, острая токсичность, хроническая токсичность, крысы, мыши, масса тела, морфология и биохимия крови.*

THE STUDY OF THE TOXICITY OF AMINOSELEFERON IN THE ACUTE AND CHRONIC EXPERIENCE**Vostroilova G.A., Khokhlova N.A., Kantorovich Yu.A., Korchagina A.A.**

All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, Voronezh, Russian Federation

*The results of the study of the parameters of acute and chronic toxicity of the complex preparation aminoseleferon are presented in the article. When studying acute toxicity in white mice and rats, there was no evidence of neurotoxicity and other vegetative symptoms. Aminoseleferon showed no toxic properties in the acute experience, LD₅₀ - could not be determined. Chronic administration of the drug did not cause significant changes in the clinical state of animals, but under its influence, a marked tendency to increase the intensity of growth in rats was noted. Aminoseleferon did not have a negative effect on the morphological and biochemical indicators of blood, which characterize the functional state of internal organs. Macroscopic examination of internal organs showed that the drug did not cause pathological changes in animals in organs and tissues. **Keywords:** aminoseleferon, acute toxicity, chronic toxicity, rats, mice, body weight, morphology and biochemistry of blood.*

Введение. К актуальным проблемам современного животноводства относятся различные болезни, в этиологии которых такие инфекционные агенты, как вирусы и микробы, играют весьма важную роль. Проблема осложняется тем, что у некоторых из них вирулентные и патогенные свойства значительно повышаются на фоне неблагоприятных условий содержания и неполноценного кормления животных, что довольно часто наблюдается в наших хозяйствах. На фоне постоянного стрессового состояния организма возникает иммунодепрессия, что приводит к ослаблению устойчивости организма к воздействию патогенной и условно-патогенной микрофлоры вирусно-бактериального происхождения. Также многие вирусные заболевания наслаиваются на бактериальные, протекают совместно с ними, вызывая микстинфекции [1, 2].

Поэтому в современной ветеринарии все шире применяются иммуномодуляторы. Из известных в настоящее время средств противовирусного действия практическое применение смогли найти лишь отдельные, одними из которых являются интерфероны (ИФН) (лат. *inter* – взаимно, между собой и *ferio* – ударяю, поражаю) – ряд цитокинов (белковых молекул), с помощью которых клетки иммунной системы могут обмениваться информацией и осуществлять координацию действий. Они представлены практически во всех клетках организма и направлены на подавление репликации вирусов, их элиминацию и санацию организма [1, 3, 4, 5].

Существуют естественные ИФН, полученные из лейкоцитов и лимфоцитов донорской крови, и рекомбинантные, полученные генно-инженерным способом. Отличительной особенностью рекомбинантных ИФН является то, что они продуцируются вне организма бактериальными штаммами (*Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, дрожжи), в генетический материал которых встроены ген человеческого или животного ИФН [5, 6].

Наиболее изученными являются интерфероны двух типов. ИФН типа I представлены семействами ИФН-α, которые преимущественно синтезируются лейкоцитами, и ИФН-β, который синтезируется большинством типов клеток, но особенно фибробластами. К ИФН II типа относится ИФН-γ, который синтезируется в ответ на распознавание инфицированных клеток активированными Т-лимфоцитами и плазматическими клетками [7].

Доказано, что система ИФН играет одну из центральных ролей в иммунорегуляции, включает механизмы врожденного и адаптивного иммунного ответа, является первой линией защиты от вирусных и других внутриклеточных инфекций, участвует в поддержании гомеостаза организма. ИФН и их индукторы, являясь центральными пусковыми молекулами системы ИФН, эффективно предупреждают самые ранние негативные процессы взаимодействия носителей чужеродной информа-

ции с организмом [8].

Для нормализации функций иммунной системы разработаны и успешно применяются различные иммуномодуляторы природного происхождения. На основе одного из них - аминокселетона (продукта криофракционирования селезенки КРС) и интерферона свиного рекомбинантного, создан препарат аминокселеферон.

При доклинической оценке безопасности лекарственных средств обязательным является проведение токсикологических исследований, что особенно важно для препаратов, имеющих в своем составе белковые фракции и высокомолекулярные соединения [9, 10].

Цель исследования: определение острой и хронической токсичности препарата «Аминокселеферон».

Материалы и методы исследований. Эксперименты по оценке острой и хронической токсичности препарата «Аминокселеферон» были проведены на белых нелинейных мышах и белых крысах. Все исследования проведены на базе отдела фармакологии и вивария ГНУ ВНИВИГФиТ. Содержание животных и все манипуляции с ними в рамках эксперимента проводили в соответствии с положениями Европейской конвенции по защите позвоночных животных (принята в Страсбурге 18.03.1986, подтверждена в Страсбурге 15.06.2006) и правилами надлежущей лабораторной практики в РФ (ГОСТ 33044-2014). Температура воздуха поддерживалась в пределах 18-23°C при относительной влажности 45-60%. Доступ к воде и корму был свободным. Группы для проведения опытов были сформированы по принципу аналогов, используя в качестве критерия массу тела (из расчета $\pm 10\%$ по массе тела).

В первой серии опытов острая токсичность аминокселеферона испытана при пероральном способе введения. Препарат вводили однократно внутрь в дозах от 5000 до 30000 мг/кг в объеме 0,5 мл на мышь и 5,0 мл на крысу (дозы являются предельно допустимыми по объему для перорального введения).

Во второй серии опытов испытана острая токсичность аминокселеферона при подкожном способе введения. Препараты вводили однократно подкожно в дозах от 5000 до 30000 мг/кг в объеме 1,0 мл на мышь и 5,0 мл на крысу (дозы являются предельно допустимыми по объему для подкожного введения).

Хроническую токсичность препарата «Аминокселеферон» изучали при подкожном введении в течение 60 дней в дозах 0,1 и 2,0 мл/кг массы тела (условно-терапевтическая и в 20 раз превышающая ее).

Общетокическое действие препаратов оценивали по динамике массы тела животных при взвешивании 1 раз в неделю, морфологическим и биохимическим показателям крови животных. Для исследования внутренних органов часть грызунов из каждой группы убивали цервикальной дислокацией через 2 месяца от начала введения препаратов. Внутренние органы (сердце, печень, легкие, почки, надпочечники, селезенку, семенники, тимус) взвешивали и рассчитывали их весовые коэффициенты ($m_{\text{органа}}/m_{\text{крысы}} \times 1000$), изучали макроструктуру внутренних органов. Исследования морфологических и биохимических показателей крови проводили на гематологическом анализаторе «ABXMicros 60» и биохимическом анализаторе «Hitachi-902» согласно утвержденным методическим рекомендациям и в соответствии с инструкциями к приборам.

Во всех перечисленных экспериментах использовали контрольные группы животных той же численности и состава, что и опытные. Контрольным животным вводили физиологический раствор.

Результаты исследований. В первой серии опытов при исследовании острой токсичности аминокселеферона при введении внутрь в дозах 5000-30000 мг/кг за весь период наблюдения (14 дней) гибели животных отмечено не было.

Среднелетальную дозу (LD_{50}) определить не удалось, так как при введении внутрь препаратов в максимально возможных объемах в дозе 30000 мг/кг массы тела не отмечалось гибели животных. Таким образом, препарат по степени токсичности относится к IV классу опасности – малоопасные вещества [11].

Во второй серии опытов при подкожном введении препарата в дозах от 5000 до 30000 мг/кг гибели животных за весь период наблюдения (14 дней) отмечено не было. Среднелетальную дозу - LD_{50} определить не удалось, так как при подкожном введении аминокселеферона в максимально возможных объемах в диапазоне изученных доз гибели животных не наблюдалось.

Проявления общего действия аминокселеферона при подкожном введении мышам и крысам представлены в таблицах 1 и 2.

При двухнедельном наблюдении за животными (мышь и крысы) отмечено сохранение нормальной координации движений, болевой чувствительности и адекватной реакции на внешние раздражители. Не отмечалось расстройств дефекации, мочеиспускания, других вегетативных симптомов и признаков нейротоксичности. На протяжении двух недель наблюдения изменений в общем состоянии и поведении животных, как и случаев гибели, не было отмечено.

Патоморфологическое изучение по окончании эксперимента не выявило нарушений в структурной организации внутренних органов, как при пероральном, так и подкожном способе введения.

Таблица 1 - Проявление общего действия аминоселеферона у мышей

Дозы, мл/кг	Число мышей, гол.	Реакция животных
5,0	10	Кратковременное (до 30 минут) повышение возбудимости и исследовательской реакции, в дальнейшем отклонений в поведении и состоянии животных не отмечается. Гибели нет.
15,0	10	Кратковременное (до 1 часа) повышение возбудимости и исследовательской реакции, в дальнейшем отклонений в поведении и состоянии животных не отмечается. Гибели нет.
30,0	10	Кратковременное угнетение, проходящее в течение часа. В дальнейшем на протяжении 14 суток отклонений в поведении и состоянии мышей не отмечается. Гибели нет.

Таблица 2 - Проявление общего действия аминоселеферона у крыс

Дозы, мл/кг	Число крыс, гол.	Реакция животных
5,0	10	Видимая реакция на введение отсутствует, в дальнейшем отклонений в поведении и состоянии животных не отмечается. Гибели нет.
15,0	10	Видимая реакция на введение отсутствует, в дальнейшем отклонений в поведении и состоянии животных не отмечается. Гибели нет.
30,0	10	Кратковременное (до 1 часа) повышение возбудимости и исследовательской реакции, в дальнейшем отклонений в поведении и состоянии животных не отмечается. Гибели нет.

Введение аминоселеферона в течение 60 дней не вызвало существенных изменений в клиническом состоянии животных: поведение, груминг, аппетит, частота дыхания у всех животных опытных групп, как в период применения препарата, так и в течение трех недель после окончания применения, оставались в пределах нормы. За период наблюдения у животных опытных групп не было отмечено нарушений функций пищеварения и мочеотделения. Подопытные животные потребляли обычное количество корма и воды. Случаев гибели животных опытных и контрольных групп не отмечалось.

Животные контрольной и опытных групп, получавшие аминоселеферон, не отличались по аппетиту, но интенсивность роста у них была различной.

В проведенном опыте контрольные крысы росли неравномерно. Самая низкая интенсивность роста была в первые две недели после начала опыта и между 4-й и 6-й неделями. В эти периоды она не превышала 5,2%. Максимальная скорость роста отмечена на третьей неделе, когда она составила 25,8%. В целом за период наблюдений общий прирост шел постоянно и составил 107,1% к исходному.

Применение аминоселеферона оказало существенное влияние на интенсивность роста животных. В опытных группах, также как и в контроле, наблюдается неравномерный рост молодых животных. Под влиянием препарата в дозе 0,1 мл/кг массы тела проявлялась выраженная тенденция повышения интенсивности роста крыс. Так, если разница между опытной и контрольной группами по интенсивности роста в конце второй недели составила 14,4%, то, начиная с середины пятой недели от начала опыта, разница достигла 29,1% и такой оставалась до конца испытаний. Применение аминоселеферона дозе 2,0 мл/кг проявило такое же, но менее выраженное влияние на рост белых крыс.

Данные таблицы 3 показывают, что соотношения массы внутренних органов к массе тела крыс как в опытных, так и в контрольной группе достоверно не отличаются и находятся в пределах физиологической нормы. Сравнительный анализ полученного материала говорит о том, что повышение интенсивности роста животных не сопровождается повышением массы всех внутренних органов или какого-либо из них, включая органы иммунной и эндокринной систем. В то же время это свидетельствует об отсутствии дополнительной нагрузки на органы, а также токсического воздействия изучаемого препарата и о его хорошей переносимости организмом животных.

При проведении патоморфологических исследований внутренних органов у крыс, как опытных, так и контрольных групп, не выявлено патологических изменений в строении органов и тканей.

Серозные оболочки полостей имели ярко-розовый цвет, гладкую и блестящую поверхность. Легкие не увеличены, симметрично расположены, легочная ткань розового цвета. Плевра имела гладкую поверхность. Сердце не увеличено, перикард и эпикард гладкие, блестящие. Миокард умеренно плотный, ярко-красного цвета. Печень – с заостренными краями и гладкой капсулой, не увеличена. С поверхности и на разрезе – темно-вишневого цвета с хорошо выраженным рисунком. Сосуд не обильный. Желчный пузырь заполнен желчью желто-зеленого цвета, жидкой консистенции.

Пройодимость желчных протоков сохранена. Селезенка не увеличена, вытянутой формы, с острыми краями и гладкой капсулой, имеющей с поверхности сероватый цвет. На разрезе структура органа хорошо выражена, соскоб с пульпы не обильный. Серозная оболочка желудка и кишечника имела гладкую блестящую поверхность серого цвета. Слизистая оболочка желудка, тонкого и толстого отделов кишечника на всем протяжении имела ярко-розовый цвет, гладкую блестящую поверхность. Почки не увеличены, симметричны, темно-вишневого цвета. Фиброзная капсула почек легко снимается. Коровое и мозговое вещество на разрезе хорошо различимы, слизистая лоханки светло-розового цвета, гладкая, блестящая.

Таблица 3 - Относительная масса внутренних органов белых крыс при многократном применении аминокселеферона

Орган	Контроль	Аминоселеферон
Тимус	0,96±0,02	1,00±0,03
Легкие	6,8±0,47	6,7±0,25
Сердце	3,7±0,15	3,7±0,22
Печень	32,4±1,58	33,8±0,75
Селезенка	3,9±0,36	4,0±0,37
Почки	7,4±0,58	7,3±0,42
Надпочечники	0,17±0,02	0,17±0,01

В то же время, хроническое подкожное введение аминокселеферона дозах 0,1 и 2,0 мл/кг оказало стимулирующее влияние на гемопозитические органы, выражающееся в увеличении содержания гемоглобина на 9,1%, количества эритроцитов – на 10,7%, по сравнению с контрольными животными. Следует особо подчеркнуть, что аминокселеферон в дозе, в 20 раз превышающей терапевтическую (2,0 мл/кг), не оказал влияния на содержание эозинофилов, что может служить косвенным доказательством отсутствия его аллергизирующего влияния.

При исследовании крови животных, длительно получавших изучаемые препараты, не отмечено достоверных изменений в биохимических показателях по сравнению с животными контрольной группы (таблица 4).

Аминоселеферон не оказал влияния на изученные показатели липидного и углеводного обмена, однако отмечена тенденция к повышению интенсивности азотистого обмена (таблица 4).

Таблица 4 - Биохимические показатели крови белых крыс при внутримышечном применении аминокселеферона в течение 60 дней

Показатели	Контроль	Доза, мл/кг	
		0,1	2,0
Общий белок, г/л	71,2±3,70	72,9±5,32	74,0±1,97
Альбумины, %	37,1±2,84	35,8±3,27	40,9±1,12
Альфа-глобулины, %	16,6±1,45	15,4±1,64	15,9±1,28
Бета-глобулины, %	11,3±1,19	11,2±0,88	15,4±1,46
Гамма-глобулины, %	30,4±2,47	29,8±2,17	29,9±1,83
Мочевина, мм/л	3,4±0,21	4,5±0,31*	4,8±0,41*
Глюкоза, мм/л	5,1±0,36	5,2±0,28	5,0±0,37
Общие липиды, г/л	4,2±0,36	4,6±0,21	4,4±0,36
Холестерин, мм/л	2,7±0,25	3,3±0,23	3,0±0,23
Триглицериды, мм/л	0,71±0,07	0,75±0,12	0,79±0,03
АсАТ, ЕД/л	75,8±7,10	77,1±3,22	78,0±2,12
АлАТ, ЕД/л	46,4±1,80	44,6±3,29	45,8±1,91
Креатинин, мкМ/л	79,5±5,03	83,1±5,47	88,6±5,36
Щелочная фосфатаза, ЕД/л	191,2±6,13	191,5±7,12	196,0±5,28
Билирубин, мкМ/л	1,65±0,16	1,71±0,30	1,69±0,22

Примечание: *P<0,05-0,01.

Заклучение. В результате проведенных испытаний нового препарата «Аминоселеферон» было установлено, что LD₅₀ как при внутрижелудочном, так и при подкожном введении белым мышам и крысам превышает 30000 мг/кг, следовательно, по степени токсичности он относится к IV классу опасности - малоопасным веществам. При изучении хронической токсичности аминокселеферона установлено, что препарат при подкожном введении в течение 60 дней в терапевтической дозе (0,1 мл/кг) и в 20 раз превышающей терапевтическую (2,0 мл/кг), не вызывает изменения поведения и общего состояния крыс, нарушений гемопоза, функции печени, почек. Под влиянием препарата в дозе 0,1 мл/кг массы тела проявлялась выраженная тенденция повышения интенсив-

ности роста крыс. Аминоселеферон не оказывает влияния на интегральные морфологические и биохимические показатели крови, характеризующие функциональное состояние внутренних органов, не вызывает изменений метаболических процессов в печени и нарушений ее обезвреживающей функции. Препарат, примененный в дозе, в 20 раз превышающей терапевтическую, не оказал существенного влияния на содержание эозинофилов, что может служить косвенным доказательством отсутствия его аллергизирующего действия.

При проведении патоморфологических исследований у крыс, как опытных, так и контрольной групп макроскопически не было выявлено патологических изменений в строении органов и тканей.

Литература. 1. Красочко, П. А. Определение токсикологических показателей комплексного интерферонсодержащего препарата / П. А. Красочко, И. В. Чуенко // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства, 2013. - № 16 (2). - С.314-322. 2. Кучинский, М. П. Острая токсичность и специфическая эффективность комплексного препарата на основе антибактериальной и противовирусной субстанций / М. П. Кучинский // Научно-технический бюллетень Института биологии тварин і Державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок. - 2013. - Вип. 14, № 3-4. - С. 173-178. 3. Эффективность применения биферона-Б коровам в период запуска и перед отелом / О. А. Козлова, Г. Ф. Медведев, М. И. Потапович, В. А. Прокулевич // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства : сборник научных трудов / гл. ред. М. В. Шалак. - Горки : БГСХА, 2018. - вып. 21. - в 2 ч. - Ч. 2. - С. 3-10. 4. Иммуностимулирующий эффект биферона-С на фоне медикаментозной профилактики болезней свиноматок в промышленном свиноводстве / А. Г. Шахов [и др.] // Сельскохозяйственная биология. - 2018. - Т. 53, № 4. - С. 851-859. 5. Ших, Е. В. Рекомбинантный интерферон альфа-2b с оксидантами (альфа токоферола ацетат и аскорбиновая кислота): эффективность с точки зрения взаимодействия препаратов / Е. В. Ших, М. Н. Дорофеева // Педиатрия, 2015. - Том 94, № 5. - С. 149-155. 6. Goodbourn, S. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures / S. Goodbourn, L. Didcock, R. E. Randall // Journal of General Virology. - 2000. - Vol.81. - P. 2341-2364. 7. Johnson, H. M. . Gamma Interferon: From Antimicrobial Activity to Immune Regulation / H. M. Johnson // Frontiers in Immunology. - 2014. - № 5, - P. 667. 8. Наровлянский, А. Н. Интерфероны: перспективные направления исследований / А. Н. Наровлянский, Ф. И. Ершов, А. Л. Гинцбург // Иммунология. - 2013. - №3. - С. 168-172. 9. Васильев, А. Н. Разработка национальной программы качественных доклинических исследований биологически аналогичных лекарственных препаратов рекомбинантного интерферона альфа-2b / А. Н. Васильев // Автореф. дис. ... докт. биол. наук : 14.03.06. - Волгоград, 2012. - 48 с. 10. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А. Н. Миронова. - Москва : Гриф и К, 2012. - 944 с. 11. Березовская, И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения / И. В. Березовская // Химико-фармацевтический журнал. - 2003. - Т. 37, №3. - С. 32-34.

Статья передана в печать 28.09.2018 г.

УДК 619:616-001.28/.29+636:612+615

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ КОМБИНИРОВАННОГО РАДИАЦИОННО-ТЕРМИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ ОРГАНИЗМА

Гайнутдинов Т.Р., Вагин К.Н., Низамов Р.Н.

ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань, Российская Федерация

Учитывая, что в современных условиях техногенеза, аварий на ядерных реакторах и энергетических установках, когда возможно комбинированное действие излучений и термических факторов: пламени пожара, перегретого пара и др., лечение таких поражений становится весьма серьезной задачей и актуальной проблемой, поскольку существующие средства терапии во многих случаях являются малоэффективными. С учетом изложенного, нами проведены исследования, целью которых является разработка способа получения комплексного лечебного средства при комбинированном радиационно-термическом поражении организма. Указанная цель достигается путем 3-кратного подкожного введения пораженному организму в первые часы после радиационно-термического поражения (РТТ) разработанной нами противолучевой сыворотки [5] с интервалом 24, 48 и 168 часов после нанесения радиационно-термической травмы, в смеси с продуктами метаболизма бифидобактерий, полученных при выращивании бифидобактерий, в соотношении 0,5:0,5 в дозе 18,5-28 мг/кг по белку и с последующим нанесением через 24, 48 и 168 часов на пораженный участок мази на основе продуктов пчеловодства (подмор пчел, прополис, воск, вазелин, ланолин) и зверобойного масла. **Ключевые слова:** облучение, термическая травма, ионизирующее излучение, препарат, лечение.

THE METHOD OF PRODUCING DRUG FOR TREATMENT OF COMBINED RADIATION-THERMAL DESTRUCTION OF THE BODY

Gaynutdinov T.R., Vagin K.N., Nizamov R.N.

Federal center for toxicological, radiation and biological safety, Kazan, Russian Federation

Given that in modern conditions of technological Genesis of the accident at nuclear reactors and power plants, when the combined effect of radiation and thermal factors is possible: fire, superheated steam, etc., the treatment of such lesions becomes a very serious task and an urgent problem, since the existing means of therapy in many cases